

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-052392

(43)Date of publication of application : 25.02.2003

(51)Int.Cl.

C12Q 1/04
G01N 21/77
// C12N 1/14
C12N 1/16

(21)Application number : 2001-244586

(71)Applicant : KANTO CHEM CO INC

(22)Date of filing : 10.08.2001

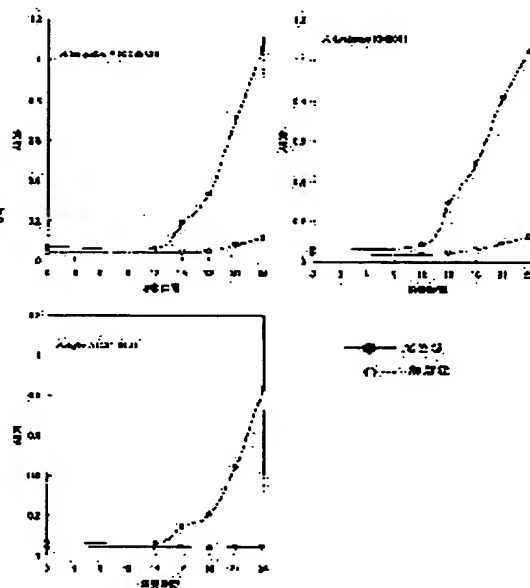
(72)Inventor : NAKANO RINTA
KURIHARA MAKOTO

(54) METHOD FOR DETECTING MICROORGANISM AND KIT FOR DETECTING MICROORGANISM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for detecting a microorganism, by which the proliferation of the microorganism, especially a yeast-like fungus and a mold, can be objectively judged in a simple operation to detect the microorganism in a food and carry out an inspection such as a medicine sensitivity test for selecting the optimal medicine on the treatment of a patient infected with the microorganism, to provide a medicine sensitivity test method using the method, and to provide a kit used therefor.

SOLUTION: This method for detecting the microorganism comprises reacting a coloring reagent containing an oxidation-reduction coloring matter with an alkaline sensitizing reagent in a liquid culture medium inoculated with a specimen and then detecting the microorganism by the coloration in the reaction. The medicine sensitivity test method using the method. And, the kit used therefor.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

Best Available Copy

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

- [Claim 1] The approach add, make the color reagent and the alkaline sensitization test solution containing oxidation reduction coloring matter react in the liquid medium which inoculated the specimen, and the coloration in this reaction detects a microorganism.
- [Claim 2] The approach according to claim 1 characterized by microorganisms being yeast-like fungi and/or mold.
- [Claim 3] The approach according to claim 1 or 2 that a liquid medium is characterized by including nonreducing sugar.
- [Claim 4] The kit for detecting a microorganism characterized by including the color reagent, the liquid medium, and the alkaline sensitization test solution containing oxidation reduction coloring matter.
- [Claim 5] The kit according to claim 4 characterized by oxidation reduction coloring matter being the water-soluble tetrazolium salt which generates water-soluble formazan.
- [Claim 6] the tetrazolium salt which generates water-soluble formazan — 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfo phenyl)- the kit according to claim 5 characterized by being 2H-tetrazolium 1 sodium salt.
- [Claim 7] The kit according to claim 4 to 6 with which a color reagent is characterized by including further an electronic carrier, potassium ferricyanide, and potassium ferrocyanide.
- [Claim 8] The kit according to claim 7 characterized by an electronic carrier being 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate.
- [Claim 9] The kit according to claim 4 to 8 with which a liquid medium is characterized by including nonreducing sugar.
- [Claim 10] The kit according to claim 9 characterized by nonreducing sugar being sucrose.
- [Claim 11] The kit according to claim 4 to 10 characterized by an alkaline sensitization test solution being what makes pH of a liquid medium nine or more.
- [Claim 12] The kit according to claim 4 to 11 characterized by an alkaline sensitization test solution being a sodium-hydroxide water solution.
- [Claim 13] How to examine the drug sensitivity of a microorganism which add, and the color reagent and the alkaline sensitization test solution containing oxidation reduction coloring matter are made to react in the liquid medium containing the antibacterial drug which inoculated the specimen, and is characterized by judging a minimum inhibitory concentration from the coloration in this reaction.
- [Claim 14] The approach according to claim 13 characterized by microorganisms being yeast-like fungi and/or mold.
- [Claim 15] The approach according to claim 13 or 14 that a liquid medium is characterized by including nonreducing sugar.
- [Claim 16] The kit for the drugs sensitivity test of a microorganism characterized by including an antibacterial drug in the kit for detection according to claim 4 to 12 further.
- [Claim 17] The kit according to claim 16 characterized by an antibacterial drug being an antifungal drug.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the approach and kit for inspecting the drugs sensitivity test aiming at choosing the optimal drugs, when treating the patient as for whom the microorganism in food did detection and microorganism infection etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] The true fungi containing yeast-like fungi or mold serve as a cause bacillus of food putrefaction, especially the Aspergillus group which is mold, and a Penicillium group produce the mycotoxin which is carcinogens, such as an aflatoxin. Moreover, it is also the reason bacillus of deep seated mycosis with which the increment poses a problem in recent years. Since it is such, it is very important to detect these bacilli hygienically and medically.

[0003] Although the cultivation which used the agar medium and the liquid medium is usually used for inspection of these bacilli, since the inspection by cultivation needs the days for two - seven days, the die length of inspection time amount poses a problem. Moreover, in the approach using a liquid medium, the turbidimetry which mainly judges measurement of whenever [growth] by muddiness of culture medium is adopted. However, although this approach is suitable for bacteria, such as Escherichia coli, the dispersibility of a fungus, especially mold, etc. is not suitable to a bad strain, and the problem that exact measurement cannot be performed is pointed out.

[0004] In order to solve these problems, he is Matrai and others. Its attention is paid to the invertase (beta-D-fructofuranosidase) which an Aspergillus group and a Penicillium group have. By carrying out colorimetric measurement of the glucose produced in case it cultivates by the culture medium containing sucrose How to enable detection of a bacillus in 20 - 48 hours is reported (Matrai T., et.al., Int.J.Food Microbiol.61, 187-191, 2000). However, this approach needs to heat-treat culture medium at the time of a judgment, and is complicated. [of actuation]

[0005] Moreover, the quick detecting method adapting various principles for which it does not depend on cultivation is developed, and the PCR method is already beginning (mycosis gene diagnosis, MEJIKARU sense company) to be used [by the food field] for the ATP biotechnology luminescence method with installation of HACCP in recent years in (an antifungal society magazine, 28,601-609 and 2000) and a medical field for environmental analysis or quality control. However, the ATP method also detects ATP of the origin except a bacillus, and also has the problem of needing a special image processing system, and has the problem of also detecting the reaction inhibition by the contaminant, and the gene of a bacillus which became extinct in the PCR method. Although there is a fluorescence stain as the other approaches (an antifungal society magazine, 28,601-609, 2000), since commercial equipment is tens of millions of yen or more and a large sum, there is a problem that inspection cost costs very dearly. Since it is such, it looks forward to the method of detecting specifically quickly and simple still more cheaply a microorganism especially a yeast stock fungus, and mold.

[0006] Establishment of the test method based on a measuring method is desired whenever [growth / of a simple and reliable bacillus] from on the other hand selection of the suitable remedy for this infectious disease being indispensable also in the drugs sensitivity test method of a fungus with the appearance of the strain which shows resistance to a rise and antifungal drug of the onset frequency of deep seated mycosis. In the U.S., National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) It will be related with the drugs sensitivity test method of yeast-like fungi in 1997. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts; Approved Standard (M27-A) again It will be related with the sensitivity test method of mold in 1998. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Proposed Standard (following M38-P) It has proposed. however, these approaches — a strain — culture time amount — two days — or for this reason, a test result will require long duration even for even coming out for three days. Moreover, since each of these approaches is performed by turbidimetry, they is not suitable for the fungus increased massive, and has the trouble of being especially hard to decipher the bacillus growth end point (80% bacillus growth control) in azole system drugs. For this reason, it is more simple and the decipherment approach of the bacillus growth end point where repeatability is high is desired.

[0007] As one of the means to solve these troubles, the colorimetric method which measures whenever [growth / of a bacillus] by colorimetry is developed variously. Until now The approach using 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2 and 5-diphenyl-2 H tetrazolium bromide (MTT) which is tetrazolium salt () [Meletiadis J.] J.Clin.Microbiol., 38, 2949-2954, 2000, The approach using AlamarBlue™ (Alamar Biosciences Inc., Sacramento, Calif.) which is a redox indicator () [Jahn B.,] [J.Clin.Microbiol.] The vital stain (JP,7-107995,A) using 34, 2039-2041, 1996, and neutral red etc. is reported. However, the MTT method and the neutral red method have the complicated actuation at the time of a judgment, by the approach using AlamarBlue™, may not produce fluorescence by strain and have the problem that growth inhibition concentration cannot be judged.

[0008] Moreover, Nakano and others has reported the drugs sensitivity test approach using the microplate for drugs sensitivity tests and it which solid-phase-ized drugs and tetrazolium salt, 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate (1-methoxy PMS), potassium ferricyanide, and potassium ferrocyanide (JP,11-287796,A). However, it was only the yeast-like fungi which can be measured with this microplate and the test method using it, and it was difficult to apply to mold.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Therefore, in order that the purpose of this invention may inspect a drugs sensitivity test etc. for the purpose of choosing the optimal drugs when treating the patient as for whom the microorganism in food did detection and microorganism infection in view of the trouble of the above-mentioned conventional technique, It is in objective and offering the kit used for the drugs sensitivity test approach and them using the approach of judging for a short time, and this approach by simple actuation about growth of a microorganism especially yeast-like fungi, and mold.

[0010]

[Means for Solving the Problem] The result examined variously that this invention persons should solve the above-mentioned technical problem, WST-8 (water soluble disulfonated tetrazolium salt 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfo phenyl)-2H-tetrazolium 1 sodium-salt: —) Ishiyama M., et al., Talanta, 44 : Make 1299-1305, 1997, etc. into the start. By being decomposed, and combining the color reagent containing the water-soluble tetrazolium salt which carries out coloration sharply to the bottom of alkaline conditions, and the liquid medium containing nonreducing sugars, such as sucrose, after producing and cheating out of formazan It came to complete a header and this invention for the ability of whenever [growth / of a microorganism especially yeast-like fungi, and mold] to be measured with a colorimetric method simple in a short time.

[0011] That is, in the liquid medium which inoculated the specimen, this invention adds, makes the color reagent and the alkaline sensitization test solution containing oxidation reduction coloring matter react, and relates to the approach the coloration in this reaction detects a microorganism. Moreover, this invention relates to said detection approach characterized by microorganisms being yeast-like fungi and/or mold. Furthermore, it is related with said detection approach that this invention is characterized by a liquid medium containing nonreducing sugar.

[0012] Furthermore, this invention relates to the kit for detecting a microorganism characterized by including the color reagent, the liquid medium, and the alkaline sensitization test solution containing oxidation reduction coloring matter. Furthermore, it is related with said kit for detection characterized by this invention being water-soluble tetrazolium salt to which oxidation reduction coloring matter generates water-soluble formazan. moreover, the tetrazolium salt to which this invention generates water-soluble formazan — 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfo phenyl)- it is related with said kit for detection characterized by being 2H-tetrazolium 1 sodium salt. Furthermore, it is related with said kit for detection with which this invention is characterized by a color reagent containing further an electronic carrier, potassium ferricyanide, and potassium ferrocyanide. Moreover, this invention relates to said kit for detection characterized by an electronic carrier being 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfate. Furthermore, it is related with said kit for detection with which this invention is characterized by a liquid medium containing nonreducing sugar. Moreover, this invention relates to said kit for detection characterized by nonreducing sugar being sucrose. Furthermore, it is related with said kit for detection characterized by this invention being that to which an alkaline sensitization test solution makes pH of a liquid medium nine or more. Moreover, this invention relates to said kit for detection characterized by an alkaline sensitization test solution being a sodium-hydroxide water solution.

[0013] Furthermore, in the liquid medium containing the antibacterial drug which inoculated the specimen, this invention adds, makes the color reagent and the alkaline sensitization test solution containing oxidation reduction coloring matter react, and relates to the approach of examining the drug sensitivity of a microorganism characterized by judging a minimum inhibitory concentration from the coloration in this reaction. Moreover, this invention relates to said test method characterized by microorganisms being yeast-like fungi and/or mold.

[0014] It is related with said test method with which this invention is characterized by a liquid medium containing nonreducing sugar further again. Furthermore, this invention relates to the kit for the drugs sensitivity test of a microorganism characterized by including an antibacterial drug in said kit for detection further. Moreover, this invention relates to said kit for a trial characterized by an antibacterial drug being an antifungal drug.

[0015] Since the component which carries out coloration in response to an alkaline sensitization test solution as a color reagent is used, the color reaction in the detection actuation after culture of a microorganism can be made to perform very sharply in the approach of this invention. The coloration in this case is discriminable with viewing or the usual absorbance meter. Moreover, if oxidation reduction coloring matter, especially a water-soluble thing are chosen as a color reagent component, addition and stirring actuation of the organic solvent after color reaction are not needed. Therefore, according to the approach of this invention, a microorganism is correctly [very simple and] detectable.

[0016] On the other hand, the kit for microorganism detection and the kit for drugs sensitivity tests by this invention are portable. Therefore, it is possible to carry out each purpose, without limiting the location to carry out according to the kit by this invention.

[0017]

[Embodiment of the Invention] The carbon source used for the culture medium of this invention is sugar in which reducibility is not shown in neutrality and an alkaline solution, in order to avoid a blank reaction, and the metabolite produced according to an operation of the enzyme which the microorganism which it is going to detect produces shows reducibility in neutrality and an alkali solution. Sucrose, a sorbitol, and trehalose are raised as these examples. Since these bacilli have an invertase and produce reducing sugar when the mold which it is going to detect is an Aspergillus group and a Penicillium group, it is desirable to use sucrose.

[0018] A yeast extract, a peptone, Yeast Nitrogen Base (product made from Difco), etc. are raised as other nutrients. Moreover, when aiming at detection of only yeast-like fungi or mold, in order to suppress bacterial growth, adding antibiotics, such as a chloramphenicol, is also considered. Although any are sufficient as long as it carries out coloration of the color reagent of this invention under alkali conditions, oxidation reduction coloring matter, especially the thing containing a water-soluble thing are used more suitably. Specifically, tetrazolium salt which forms water-soluble formazan, such as WST-1, WST-3, WST-4, WST-5, and WST-8, is desirable. Especially WST-8 are used suitably.

[0019] As a component of others which are contained in a color reagent, the potassium ferricyanide and potassium ferrocyanide for adjusting the oxidation reduction potential of the electronic carrier which has the function to deliver an electron, and a culture medium are raised to a color reagent. As an electronic carrier, although PMS (phenazine methosulfate), Mel Drabble, diaphorase, 1-methoxy

PMS, etc. are used suitably, 1-methoxy PMS is used especially suitably.

[0020] As a component of the alkaline sensitization test solution used for this invention, as long as it makes pH of the culture medium after culture or more into about nine, any are sufficient, but if WST-8 formazan makes pH about nine or more, in order to present blue, especially the thing to which what makes pH about nine or more is suitably used, and makes pH ten or more is desirable. A sodium hydroxide, a potassium hydroxide, etc. are raised as an example of the component used preferably. Especially, change of volume or the ease of carrying out of addition to a sodium hydroxide is desirable. In this case, it is desirable that culture medium carries out 1/20-1 / amount addition of ten of the 1 - 2 mol/l sodium-hydroxide water solution.

[0021] As long as a microorganism detectable by the approach of this invention can be grown in a culture medium which was mentioned above, any are sufficient as it. The mold of an *Aspergillus* group and a *Penicillium* group is especially detected suitably.

[0022] If the antibacterial drug used for the drugs sensitivity test of this invention is used for the therapy of the infectious disease which uses a fungus as a reason bacillus, any will be sufficient, for example, amphotericin B, flucytosine, fluconazole, miconazole, itraconazole, and ketoconazole will be mentioned.

[0023] The kit for microorganism detection in this invention consists of a color reagent, a liquid medium, and an alkaline sensitization test solution, and the color reagent and the liquid medium may be mixed. The kit for drugs sensitivity tests in this invention consists of a color reagent, a liquid medium, an alkaline sensitization test solution, and an antibacterial drug, and the color reagent, the liquid medium, and the antibacterial drug may be mixed.

[0024] A specimen is inoculated and cultivated after adding a color reagent to a culture medium, in order to carry out this invention. Or a color reagent is added after inoculating and cultivating a specimen to a culture medium. Although a culture condition changes with strains which it is going to detect, it is 24 - 48 hours, for example at 35-37 degrees C. An alkaline sensitization test solution is added after culture, and the coloration of the culture medium of 5 - 10 minutes after is measured with viewing or an absorbance meter. The wavelength measured at this time is 620-660nm. In addition, it is desirable to produce what does not inoculate a specimen as a negative control. Moreover, when carrying out a drugs sensitivity test by this invention method, a trial bacillus is inoculated and cultivated in the microplate or test tube which poured distributively antifungal drugs, such as amphotericin B, flucytosine, fluconazole, miconazole, itraconazole, and ketoconazole, the liquid medium, and the color reagent. An alkaline sensitization test solution is added after culture, and a minimum inhibitory concentration is judged for the coloration of culture medium from viewing or an absorbance. Or after inoculating and cultivating a trial bacillus in the microplate or test tube which poured distributively the antifungal drug mentioned above and the liquid medium, an alkaline sensitization test solution is added by the color reagent following **, and the minimum growth concentration is judged for the coloration of culture medium from viewing or an absorbance.

[0025]

[Example] Although an example is given to below and this invention is further explained to a detail, this invention is not limited to the following examples.

[0026] [Example 1] The following contents were carried out in order to choose a growth culture medium.

A. Use strain *Aspergillus fumigatus* KM8001 was used.

B. It is a RPMI1640 powder culture medium to the purified water of 900ml of preparation ** glucose addition MOPS buffer RPMI1640 culture media of a test-method (1) culture medium. (L-glutamine content, sodium-hydrogencarbonate non-**, Phenol Red non-**, product made from Gibco) 10.4g, sodium hydrogencarbonate 2.0g, glucose 10.0g and a 34.53 g morpholino propane sulfonic acid (MOPS) are dissolved, and it is 1 N. It was made pH7.0 in the sodium-hydroxide water solution. To 1000ml, after carrying out a scalpel rise, it filtered with the 0.2-micrometer filter.

** Preparation purified water of a glucose YN culture medium YN Base (product made from Difco) 6.7g and glucose 5g are dissolved in about 900 mL(s), and it is 1 N. Sodium-hydroxide water solution It was made pH5.3. With purified water, after carrying out a scalpel rise, filtration sterilization was carried out to 1000mL(s) using the 0.2-micrometer filter.

** Preparation purified water of a sucrose YN culture medium They are YN Base (product made from Difco) 6.7g, and sucrose 20g to about 900 mL(s). It dissolves and is 1-N sodium-hydroxide water solution. It was made pH7.0. With purified water, after carrying out a scalpel rise, filtration sterilization was carried out to 1000mL(s) using the 0.2-micrometer filter.

[0027] (2) Preparation and culture examination strain of inoculation fungus liquid were cultivated for seven days at 35 degrees C using Sabouraud Dextrose Agar (product made from OXOID). 0.1% Tween 80 ***** physiological saline 2mL was dropped on the culture medium, and the spore was made to float. The above-mentioned physiological salines dropped on the culture medium were collected, after putting for 3 to 5 minutes and removing settlings, it mixed with the vortex mixer, and spore suspension was obtained. It diluted so that the absorbance in 530nm might be set to 0.09-0.11. the microplate after diluting the prepared spore suspension with various measurement culture media 100 times — each — 0.2ml was poured distributively to each well and color reagent (0.7 mmol/L WST -8, 0.0035 mmol/L 1-methoxy PMS, 0.5 mmol/L potassium ferricyanide, and 0.5 mmol/L potassium ferrocyanide are included) 0.02mL was added to it. In addition, the various measurement culture media (**** inoculation) which are not inoculating spore liquid as a negative control were prepared. It cultivated at 35**1 degree C for 24 hours, and the absorbance in the dominant wavelength of 450nm and 630nm of complementary-wave length was measured. after that 1.5 mol/L Sodium-hydroxide water solution 0.02mL — each — it added to the well and the absorbance in 630nm was measured after 5 minutes.

[0028] C. The result of having measured the absorbance before and behind the sodium-hydroxide water-solution addition in result each growth culture medium was summarized in Table 1. As a result of measuring the absorbance in the dominant wavelength of 450nm, and 630nm of complementary-wave length using glucose addition MOPS buffer RPMI1640 culture medium, the absorbance was quite as low as 0.153. Then, in order to raise sensibility, as a result of adding a sodium-hydroxide water solution and measuring the absorbance in 630nm, coloration was accepted also in **** inoculation. next, a glucose YN culture medium — and — The absorbance in 630nm before and behind addition of the sodium-hydroxide water solution of a sucrose YN culture medium was measured. Consequently, in the glucose YN culture medium, the phenomenon which carries out coloration in **** inoculation was seen. On the other hand, in the sucrose YN culture medium, when most coloration was not seen but a bacillus grew in **** inoculation, coloration was carried out strongly. Therefore, this invention can be carried out by using the liquid medium containing sucrose.

[0029]

[Table 1]

表 1 各種培地における水酸化ナトリウム水溶液添加前後の吸光度

	水酸化ナトリウム水溶液添加	測定波長	グルコース添加NDPS緩衝液 RPM11640培地	グルコース YN培地	シュクロース YN培地
菌未接種	前	630nm	0.045	0.015	0.013
	後	630nm	0.976	0.968	0.089
菌接種	前	主波長450nm 副波長630nm	0.153	0.024	0.017
	前	630nm	0.206	0.132	0.262
	後	630nm	0.838	0.827	0.767

[0030] [Example 2] The following contents were carried out in order to measure whenever [growth / of mold].

A. Use strain *Aspergillus fumigatus* ATCC26430, *Aspergillus fumigatus* KM8001, and *Aspergillus niger* ATCC16404 were used.

B. Preparation purified water of a test-method (1) sucrose YN culture medium They are YN Base (product made from Difco) 6.7g, and sucrose 20g to about 900 mL(s). It dissolves and is 1-N sodium-hydroxide water solution. It was made pH7.0. With purified water, after carrying out a scalpel rise, filtration sterilization was carried out to 1000mL(s) using the 0.2-micrometer filter.

(2) Preparation and culture examination strain of inoculation fungus liquid were cultivated for seven days at 35 degrees C using Sabouraud Dextrose Agar (product made from OXOID). 0.1% Tween 80 ***** physiological saline 2mL was dropped on the culture medium, and the spore was made to float. The above-mentioned physiological salines dropped on the culture medium were collected, after putting for 3 to 5 minutes and removing settlings, it mixed with the vortex mixer, and spore suspension was obtained. It diluted so that the absorbance in 530nm might be set to 0.09-0.11. 0.1ml of prepared spore suspension was extracted in the micropipette, in addition to 10ml of 0.1 mg/mL chloramphenicol ** sucrose YN culture media, it agitated enough with the vortex mixer, and inoculation fungus liquid was prepared.

[0031] (3) a turbidimetry microplate — each — it poured distributively at a time 0.2 mLs of inoculation fungus liquid prepared by (1) to the well. After covering a plate, it cultivated at 35**1 degree C. The absorbance in 630nm was measured for every fixed time amount.

(4) Colorimetric method (approach by this invention)

a microplate — each — it poured distributively at a time 0.2 mLs of inoculation fungus liquid prepared by (1) to the well with color reagent (0.7 mmol/L WST -8, 0.0035 mmol/L 1-methoxy PMS, 0.5 mmol/L potassium ferricyanide, and 0.5 mmol/L potassium ferrocyanide are included) 0.02mL. After covering a plate, it cultivated at 35**1 degree C. after 12-hour culture and three time intervals — the well under sequential culture — 1.2 mol/L sodium-hydroxide water-solution 0.02mL — each — it added to the well and the absorbance in 630nm was measured after 10 minutes. In addition, the sucrose YN culture medium was added instead of inoculation fungus liquid as a blank.

[0032] C. The absorbance measured the result culture 12, 15, and 18 and 21 or 24 hours after was shown in drawing 1. An absorbance [in / in the axis of ordinate of drawing 1 / 630nm] and an axis of abscissa show culture time amount. In this invention, the absorbance was increasing in connection with culture time amount, and extent of growth was able to be measured. Moreover, turbidity was carrying out coloration for at least 18 hours which is hardly changing, and having detected for a short time was possible. Therefore, it became clear that whenever [growth / of mold] can be measured simple with the measurement kit and measuring method of this invention.

[0033] [Example 3] The following contents were carried out for the applicability examination to an antifungal drug sensitivity test.

A. Use strain *Aspergillus fumigatus* ATCC26430 was used.

B. It was aimed at two drugs of the microplate amphotericin B for a trial (Amphotericin B; AMPH), and itraconazole (Itraconazole; ITCZ). 2 double serial dilution sequence of 0.3-160microg [/ml] AMPH and 0.16-80micro g/mL of ITCZ was prepared using dimethyl sulfoxide and purified water. every [0.02ml of prepared drugs solutions, and / a well] — a plate — after pouring distributively and solid-phase [desiccation and]-izing under 24-hour reduced pressure — said — a well — a color reagent (0.7 mmol/L WST -8, 0.0035 mmol/L 1-methoxy PMS, 0.5 mmol/L potassium ferricyanide, and 0.5 mmol/L potassium ferrocyanide are included) — 0.02ml / well — **** distributive pouring was carried out and it solid-phase[desiccation and]-ized again under 24-hour reduced pressure.

[0034] C. As an example of a test-method (1) turbidimetry comparison, it carried out according to NCCLS M-38P (micro broth dilution method of 0.2ml culture system).

(2) Preparation purified water of the microplate method 1 sucrose YN culture medium of this invention They are YN Base (product made from Difco) 6.7g, and sucrose 20g to about 900 mL(s). It dissolves and is 1-N sodium-hydroxide water solution. It was made pH7.0. With purified water, after carrying out a scalpel rise, filtration sterilization was carried out to 1000mL(s) using the 0.2-micrometer filter.

2) Preparation and culture examination strain of inoculation fungus liquid were cultivated for seven days at 35 degrees C using Sabouraud Dextrose Agar (product made from OXOID). 0.1% Tween 80 ***** physiological saline 2mL was dropped on the culture medium, and the spore was made to float. The above-mentioned physiological salines dropped on the culture medium were collected, after putting for 3 to 5 minutes and removing settlings, it mixed with the vortex mixer, and spore suspension was obtained. It diluted so that the absorbance in 530nm might be set to 0.09-0.11. 0.1ml of prepared spore suspension was extracted in the micropipette, in addition to 20ml of sucrose YN culture media, it agitated with the vortex mixer, and inoculation fungus liquid was prepared. the microplate for a trial given in B — each — after pouring 0.2ml of inoculation fungus liquid distributively to each well and covering a plate, it cultivated at 35**1 degree C for 24 hours. In addition, the sucrose YN culture medium was added instead of inoculation fungus liquid as a blank.

3) 24 hours after the judgment approach — each — a well — 1.5 mol/L Sodium-hydroxide water-solution 0.02mL was added, and the absorbance in 630nm was measured after [of addition] 5 minutes.

1. AMPH made the minimum concentration which showed electronegative control, the EQC, or the absorbance not more than it the minimum inhibitory concentration (Media Interface Connector).

2. ITCZ 80% Growth inhibition concentration (IC80) was judged. Drugs concentration of the well which is equivalent to the absorbance for which it asked by the following formulas, or shows the value not more than it was set to Media Interface Connector. (IC80= (electropositive control-negative control) x0.2+ negative control)

[0035] D. Drug sensitivity is carried out by result this invention, and the result of having measured the absorbance is shown in drawing 2. An absorbance [in / an axis of abscissa, and / in an axis of ordinate / 630nm] is shown. [the concentration of an antifungal drug]

In AMPH, the rise of an absorbance was accepted less than in 0.25microg [ml] /, and was accepted less than in 0.06microg/ml in ITCZ. In viewing, in AMPH, blue - dark blue was presented by ml less than in 0.25microg /, by ml, coloration was hardly carried out more than in 0.5microg /, but, in the case of ITCZ, blue - dark blue was presented by ml less than in 0.06microg /, and coloration was hardly carried out by ml more than in 0.12microg /. Moreover, the drugs sensitivity test was repeatedly carried out by NCCLS M-38P law and this invention method, and judged Media Interface Connector was summarized in Table 2. The reference value with which front Naka and tolerance are indicated by NCCLS M38-P is said. Consequently, Media Interface Connector judged by this invention was in agreement with the tolerance indicated by NCCLS M38-P. Moreover, Media Interface Connector judged visually was the same as that of the result judged with the absorbance. Furthermore, although judgment time amount was 46 - 50 hours in 38-NCCLS MP law, this invention was able to perform in 24 hours of abbreviation one half. Therefore, the measurement reagent and measuring method of this invention are useful to the antifungal drug sensitivity test of mold.

[0036]

[Table 2]

表 2 *A.fumigatus* ATCC26430 の MIC (数値は $\mu\text{g/ml}$)

	測定方法	MIC	許容範囲
AMPH	M-38P (濁度法)	0.5-2.0	0.5-2.0
	比色法	0.5-1.0	
ITCZ	M-38P (濁度法)	0.12-0.25	0.12-1.0
	比色法	0.12-0.25	

[0037]

[Effect of the Invention] According to the detection approach of this invention, and the detection kit, detection of a microorganism especially yeast-like fungi, and mold can be performed simple. Moreover, the drugs sensitivity test approach by this invention and the kit for it are useful to the antifungal drug sensitivity test by the broth dilution method of mold.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the graph which showed change of turbidity and the absorbance to the culture time amount in the colorimetric method of this invention.

[Drawing 2] A. fumigatus ATCC26430 It is the graph which showed change of the absorbance to the concentration of the antifungal drug at the time of performing a drugs sensitivity test.

[Translation done.]

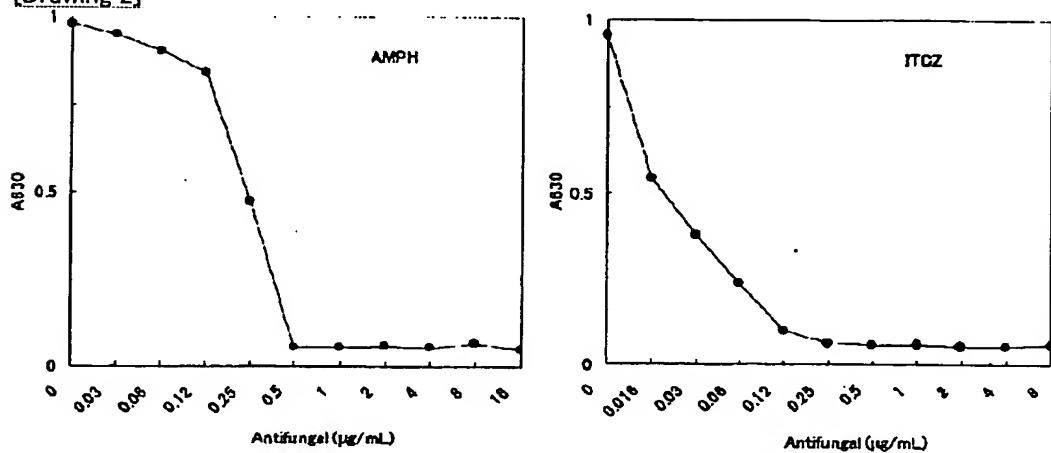
* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

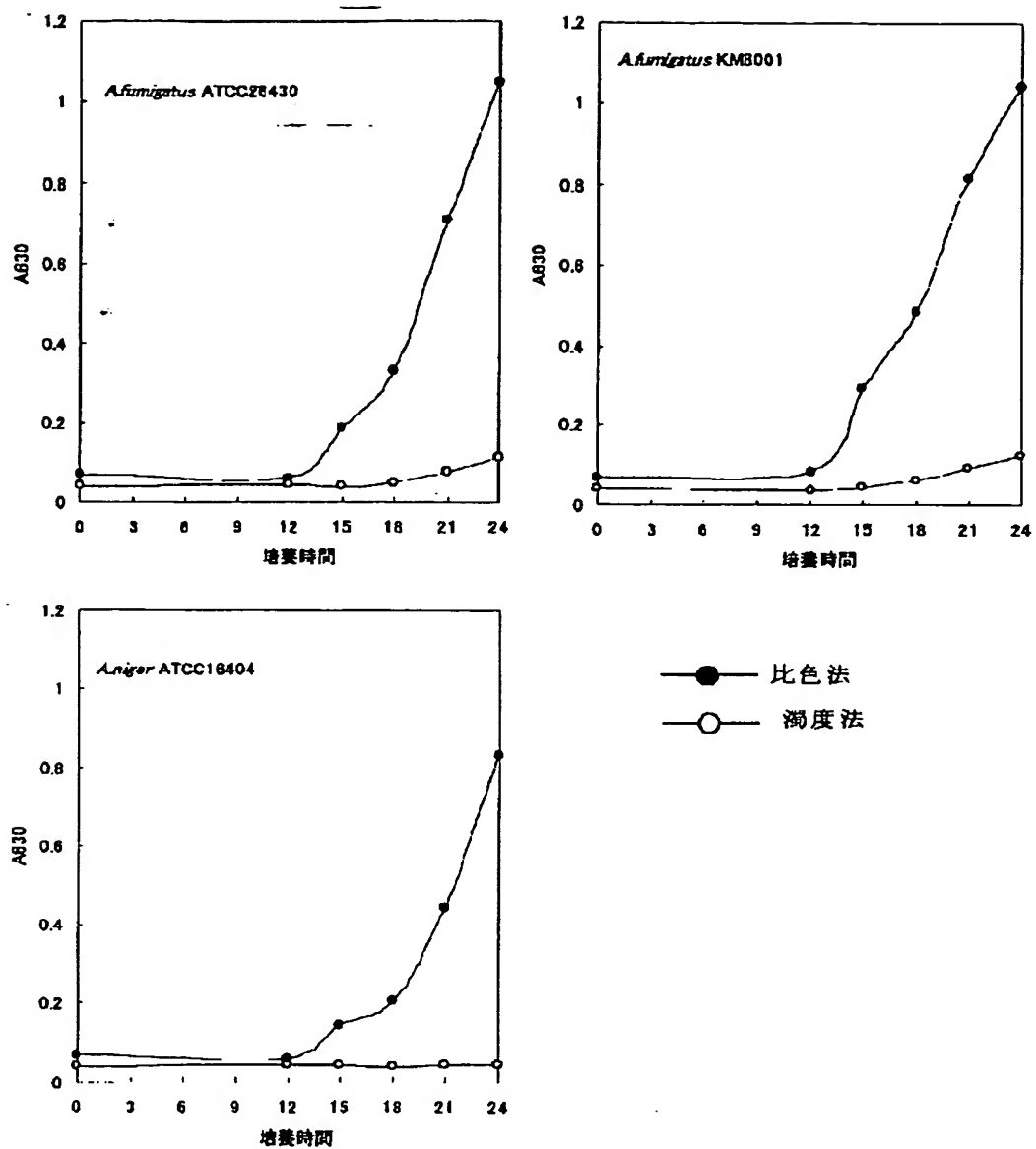
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

[Drawing 2]



[Drawing 1]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-52392

(P2003-52392A)

(43) 公開日 平成15年2月25日 (2003.2.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04	2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/77		G 0 1 N 21/77	D 4 B 0 6 3
// C 1 2 N 1/14		C 1 2 N 1/14	C 4 B 0 6 5
1/16		1/16	E

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-244586 (P2001-244586)

(22) 出願日 平成13年8月10日 (2001.8.10)

(71) 出願人 591045677

関東化学株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号

(72) 発明者 中野 倫太

神奈川県伊勢原市鈴川21番地 関東化学株式会社伊勢原研究所内

(72) 発明者 栗原 誠

神奈川県伊勢原市鈴川21番地 関東化学株式会社伊勢原研究所内

(74) 代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

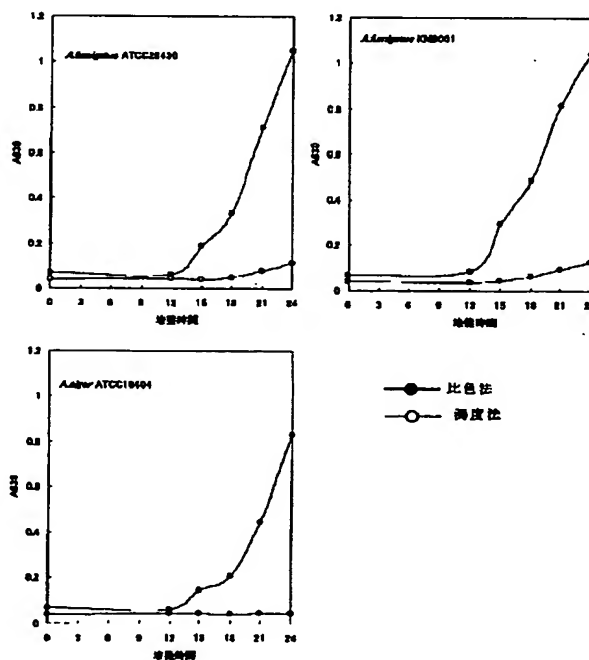
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物の検出方法および検出キット

(57) 【要約】

【課題】 食品中の微生物の検出、および微生物感染した患者を治療する上で最適な薬剤を選択することを目的とした薬剤感受性試験などの検査を行うための、微生物、特に酵母様真菌および糸状菌の増殖を簡便な操作で客観的に判定する方法、および該方法を用いた薬剤感受性試験方法ならびにそれらに用いるキットの提供。

【解決手段】 検体を接種した液体培地において、酸化還元色素を含む呈色試薬とアルカリ性増感試液とを添加し反応させて、該反応における呈色によって微生物を検出する方法、該方法を用いた薬剤感受性試験方法およびそれらに使用するキット。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体を接種した液体培地において、酸化還元色素を含む呈色試薬とアルカリ性増感試液とを添加し反応させて、該反応における呈色によって微生物を検出する方法。

【請求項2】 微生物が酵母様真菌及び／又は糸状菌であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 液体培地が、非還元糖を含むことを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 酸化還元色素を含む呈色試薬、液体培地およびアルカリ性増感試液を含むことを特徴とする、微生物を検出するためのキット。

【請求項5】 酸化還元色素が、水溶性のホルマゼンを生成する水溶性テトラゾリウム塩であることを特徴とする、請求項4に記載のキット。

【請求項6】 水溶性ホルマゼンを生成するテトラゾリウム塩が2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムナトリウム塩であることを特徴とする、請求項5に記載のキット。

【請求項7】 呈色試薬が、電子キャリアー、フェリシアン化カリウムおよびフェロシアン化カリウムをさらに含むことを特徴とする、請求項4～6のいずれかに記載のキット。

【請求項8】 電子キャリアーが1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェートであることを特徴とする、請求項7に記載のキット。

【請求項9】 液体培地が、非還元糖を含むことを特徴とする、請求項4～8のいずれかに記載のキット。

【請求項10】 非還元糖がシュクロースであることを特徴とする、請求項9に記載のキット。

【請求項11】 アルカリ性増感試液が、液体培地のpHを9以上にするものであることを特徴とする、請求項4～10のいずれかに記載のキット。

【請求項12】 アルカリ性増感試液が水酸化ナトリウム水溶液であることを特徴とする、請求項4～11に記載のキット。

【請求項13】 検体を接種した抗菌薬を含む液体培地において、酸化還元色素を含む呈色試薬とアルカリ性増感試液とを添加し反応させて、該反応における呈色から最小発育阻止濃度を判定することを特徴とする、微生物の薬剤感受性を試験する方法。

【請求項14】 微生物が酵母様真菌及び／又は糸状菌であることを特徴とする、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 液体培地が、非還元糖を含むことを特徴とする、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】 請求項4～12のいずれかに記載の検出用キットにさらに抗菌薬を含むことを特徴とする、微生物の薬剤感受性試験のためのキット。

【請求項17】 抗菌薬が抗真菌薬であることを特徴と

する、請求項16に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、食品中の微生物の検出、および微生物感染した患者を治療する上で最適な薬剤を選択することを目的とした薬剤感受性試験などの検査を行うための方法およびキットに関する。

【0002】

【従来の技術】酵母様真菌や糸状菌を含む真菌類は食品腐敗の原因菌となり、特に糸状菌である*Aspergillus*属や*Penicillium*属はアフラトキシンなどの発癌性物質であるマイコトキシンを産生する。また、近年増加が問題となっている深在性真菌症の起因菌でもある。このようなことから、これらの菌を検出することは衛生学および医学的に極めて重要である。

【0003】これら菌の検査には通常、寒天培地や液体培地を用いた培養法が用いられるが、培養法による検査は2～7日間の日数を必要とすることから、検査時間の長さが問題となっている。また、液体培地を用いた方法において、増殖度の測定は主に培養液の濁りによって判定する濁度法が採用されている。しかしながら、この方法は大腸菌などの細菌類には適しているものの、真菌、特に糸状菌などの分散性が悪い菌種に対しては適しておらず、正確な測定ができないといった問題が指摘されている。

【0004】これらの問題を解決するために、Matraiらは *Aspergillus*属や*Penicillium*属が持つインベルターゼ(β -D-フルクトフラノシダーゼ)に着目し、シュクロースを含む培地で培養する際に生じるグルコースを比色測定することによって、20～48時間で菌の検出を可能とする方法を報告している(Matrai T., et al., Int. J. Food Microbiol. 61, 187-191, 2000)。しかし、この方法は判定時に培養液を加熱処理する必要があり、操作が煩雑である。

【0005】また、近年、培養法に頼らない様々な原理を応用した迅速な検出法が開発され、すでに食品分野ではHACCPの導入に伴い環境分析や品質管理のためにATPバイオルミネッセンス法が(防菌防黴学会誌, 28, 601-609, 2000)、また医療の分野では、PCR法が利用され始めている(真菌症遺伝子診断、メジカルセンス社)。しかし、ATP法は菌以外由来のATPも検出してしまうほか、特殊な画像処理装置を必要とするといった問題があり、また、PCR法では夾雑成分による反応阻害や死滅した菌の遺伝子も検出してしまう等の問題がある。その他の方法として蛍光染色法があるが(防菌防黴学会誌, 28, 601-609, 2000)、市販の装置が数十万円以上と高額であることから、検査コストが非常に高くつくといった問題がある。このようなことから、微生物、特に酵母様真菌および糸状菌を特異的にかつ、迅速、簡便に、さらに安価に検出できる方法が待望されている。

【0006】一方、真菌の薬剤感受性試験法においても、深在性真菌症の発症頻度の上昇や抗真菌薬に耐性を示す菌株の出現にともない、本感染症に適切な治療薬の選択が必要不可欠になっていることから、簡便かつ信頼性の高い菌の増殖度測定法に基づく試験方法の確立が望まれている。米国では、National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) が、1997年に酵母様真菌の薬剤感受性試験法に関してReference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts: Approved Standard (M27-A) を、また、1998年に糸状菌の感受性試験法に関してReference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi: Proposed Standard (以下M38-P) を提案している。しかし、これらの方法は菌種によっては培養時間が2日もしくは3日かかるため、試験結果がでるまでに長時間を要する。また、これらの方法はいずれも濁度法によって行なわれているため、塊状に増殖する真菌には適しておらず、特にアゾール系薬剤での菌発育終末点(80% 菌発育抑制)が判読しにくいといった問題点がある。このため、より簡便で再現性の高い菌発育終末点の判読方法が望まれている。

【0007】これらの問題点を解決する手段の一つとして、比色により菌の増殖度を測定する比色法が種々開発されている。これまでに、テトラゾリウム塩である3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) を用いた方法(Meletiadis J. J. Clin. Microbiol., 38, 2949-2954, 2000)、酸化還元指示薬であるAlamarBlue™ (Alamar Biosciences Inc., Sacramento, Calif.) を用いた方法(Jahn B.; J. Clin. Microbiol. 34, 2039-2041, 1996)、ニュートラルレッドを用いた生体染色法(特開平7-107995)などが報告されている。しかし、MTT法やニュートラルレッド法は判定時の操作が煩雑であり、AlamarBlue™を用いた方法では菌株により蛍光を生じない場合があり発育阻止濃度を判定できないという問題がある。

【0008】また、中野らは、薬剤およびテトラゾリウム塩、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート(1-methoxy PMS)、フェリシアン化カリウムおよびフェロシアン化カリウムを固相化した薬剤感受性試験用マイクロプレートおよびそれを用いた薬剤感受性試験方法を報告している(特開平11-287796)。しかし、該マイクロプレートおよびそれを用いた試験方法で測定できるのは酵母様真菌のみであり、糸状菌に適用することは困難であった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、上記の従来技術の問題点に鑑み、食品中の微生物の検出および微生物感染した患者を治療する上で最適な薬剤を選択することを目的として薬剤感受性試験など

の検査を行うための、微生物、特に酵母様真菌および糸状菌の増殖を簡便な操作で客観的かつ短時間に判定する方法、および該方法を用いた薬剤感受性試験方法ならびにそれらに用いるキットを提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべく種々検討した結果、WST-8 (2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムナトリウム塩: water soluble disulfonated tetrazolium salt, Ishiyama M., et. al., Talanta, 44: 1299-1305, 1997)などを初めとする、分解されてホルマザンを生じせしめた後、アルカリ性条件下において鋭敏に呈色する水溶性テトラゾリウム塩などを含む呈色試薬と、シュクロースなどの非還元糖を含む液体培地を組み合わせることにより、簡便にかつ短時間に微生物、特に酵母様真菌および糸状菌の増殖度を比色法で測定できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち、本発明は、検体を接種した液体培地において、酸化還元色素を含む呈色試薬とアルカリ性増感試液とを添加し反応させて、該反応における呈色によって微生物を検出する方法に関する。また、本発明は、微生物が酵母様真菌及び/又は糸状菌であることを特徴とする、前記検出方法に関する。またさらに、本発明は、液体培地が、非還元糖を含むことを特徴とする、前記検出方法に関する。

【0012】さらに、本発明は、酸化還元色素を含む呈色試薬、液体培地およびアルカリ性増感試液を含むことを特徴とする、微生物を検出するためのキットに関する。さらに、本発明は、酸化還元色素が、水溶性のホルマザンを生成する水溶性テトラゾリウム塩であることを特徴とする、前記検出用キットに関する。また、本発明は、水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩が2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウムナトリウム塩であることを特徴とする、前記検出用キットに関する。さらに、本発明は、呈色試薬が、電子キャリアー、フェリシアン化カリウムおよびフェロシアン化カリウムをさらに含むことを特徴とする、前記検出用キットに関する。また、本発明は、電子キャリアーが1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェートであることを特徴とする、前記検出用キットに関する。さらに、本発明は、液体培地が、非還元糖を含むことを特徴とする、前記検出用キットに関する。また、本発明は、非還元糖がシュクロースであることを特徴とする、前記検出用キットに関する。さらに、本発明は、アルカリ性増感試液が、液体培地のpHを9以上にするものであることを特徴とする、前記検出用キットに関する。また、本発明は、アルカリ性増感試液が水酸化ナトリウム水溶液であることを特徴とする、前記検出用キットに関

する。

【0013】さらに、本発明は、検体を接種した抗菌薬を含む液体培地において、酸化還元色素を含む呈色試薬とアルカリ性増感試液とを添加し反応させて、該反応における呈色から最小発育阻止濃度を判定することを特徴とする、微生物の薬剤感受性を試験する方法に関する。また、本発明は、微生物が酵母様真菌及び／又は糸状菌であることを特徴とする、前記試験方法に関する。

【0014】さらにまた、本発明は、液体培地が、非還元糖を含むことを特徴とする、前記試験方法に関する。さらに、本発明は、前記検出用キットにさらに抗菌薬を含むことを特徴とする、微生物の薬剤感受性試験のためのキットに関する。また、本発明は、抗菌薬が抗真菌薬であることを特徴とする、前記試験用キットに関する。

【0015】本発明の方法においては、呈色試薬として、アルカリ性増感試液に反応して呈色する成分を用いるため、微生物の培養後の検出操作における呈色反応を極めて鋭敏に行わせることができる。この際の呈色は、目視、あるいは通常の吸光度計によって識別が可能である。また、呈色試薬成分として酸化還元色素、特に水溶性のものを選択すれば、呈色反応後の有機溶媒の添加および攪拌操作を必要としない。したがって、本発明の方法によれば、微生物の検出を、極めて簡便かつ正確に行うことができる。

【0016】一方、本発明による微生物検出用キットおよび薬剤感受性試験用キットは携帯可能である。したがって、本発明によるキットによれば、実施する場所を限定されることなく、それぞれの目的を遂行することが可能である。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明の培地に用いられる炭素源は、ブランク反応を回避するために中性およびアルカリ性溶液中で還元性を示さない糖であり、かつ、検出しようとする微生物が産生する酵素の作用によって生じた代謝物が中性およびアルカリ溶液中で還元性を示すものである。これらの例として、例えば、シュクロース、ソルビトール、トレハロースがあげられる。検出しようとする糸状菌がAspergillus属、Penicillium属の場合には、これらの菌がインベルターゼを有し還元糖を産生することから、シュクロースを用いることが好ましい。

【0018】その他の栄養源として酵母エキス、ペプトン、Yeast Nitrogen Base (Difco社製)などがあげられる。また酵母様真菌や糸状菌のみの検出を目的とする場合、細菌の発育を抑えるために、クロラムフェニコールなどの抗生物質を加えることも考えられる。本発明の呈色試薬は、アルカリ条件下で呈色するものであればいずれでもよいが、酸化還元色素、特に水溶性のものを含有するものがより好適に用いられる。具体的には、水溶性のホルマザンを形成するWST-1、WST-3、WST-4、WST-5およびWST-8などのテトラゾリウム塩は好ましい。特にWST

-8が好適に用いられる。

【0019】呈色試薬に含まれるその他の成分として、呈色試薬に電子を受け渡す機能を有する電子キャリアーならびに培地の酸化還元電位を調整するためのフェリシアン化カリウムおよびフェロシアン化カリウムがあげられる。電子キャリアーとしては、PMS (フェナジンメトサルフェート)、メルドラブルー、ジアホラーゼおよび1-methoxy PMSなどが好適に用いられるが、1-methoxy PMSが特に好適に用いられる。

【0020】本発明に用いられるアルカリ性増感試液の成分としては、培養後の培養液のpHを約9以上にするものであればいずれでもよいが、WST-8ホルマザンがpHを約9以上にすると青色を呈するため、pHを約9以上にするものが好適に用いられ、pHを10以上にするものが特に好ましい。好ましく用いられる成分の例として、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどがあげられる。中でも、液量の変化や添加のしやすさから水酸化ナトリウムが好ましい。この場合には、1~2mol/l水酸化ナトリウム水溶液を、培養液の1/20~1/10量添加するのが好ましい。

【0021】本発明の方法により検出可能な微生物は、上述したような培地中で発育可能なものであればいずれでもよい。とりわけ、Aspergillus属、Penicillium属の糸状菌が好適に検出される。

【0022】本発明の薬剤感受性試験に用いられる抗菌薬は、真菌を起因菌とする感染症の治療に用いられるものであればいずれでもよく、例えば、アムホテリシンB、フルシトシン、フルコナゾール、ミコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾールが挙げられる。

【0023】本発明における微生物検出用キットは、呈色試薬、液体培地およびアルカリ性増感試液からなるものであり、呈色試薬と液体培地は混合されていてもよい。本発明における薬剤感受性試験用キットは、呈色試薬、液体培地、アルカリ性増感試液および抗菌薬からなるものであり、呈色試薬、液体培地および抗菌薬は混合されていてもよい。

【0024】本発明を実施するには、培地に呈色試薬を添加した後、検体を接種して培養する。もしくは、検体を培地に接種して培養した後、呈色試薬を添加する。培養条件は検出しようとする菌種によって異なるが、例えば35~37℃で24~48時間である。培養後、アルカリ性増感試液を添加し、5~10分後の培養液の呈色を目視または吸光度計により測定する。この時測定する波長は620~660nmである。なお、陰性対照として検体を接種しないものを作製するのが好ましい。また、本発明法により薬剤感受性試験を実施する場合、アムホテリシンB、フルシトシン、フルコナゾール、ミコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾールなどの抗真菌薬、液体培地および呈色試薬を分注したマイクロプレートまたは試験管に試験菌を接種して培養する。培養後、アルカリ性増感

試液を添加し、培養液の呈色を目視または吸光度より最小発育阻止濃度を判定する。もしくは、上述する抗真菌薬、液体培地を分注したマイクロプレートまたは試験管に試験菌を接種して培養した後、呈色試薬次いでアルカリ性増感試液を添加し、培養液の呈色を目視または吸光度より最小発育濃度を判定する。

【0025】

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0026】【実施例1】発育培地の選択をするために以下の内容を実施した。

A. 使用菌株

Aspergillus fumigatus KM8001を使用した。

B. 試験方法

(1) 培地の調製

①グルコース添加MOPS緩衝RPMI1640培地

900mlの精製水にRPMI1640粉末培地（L-グルタミン含有、炭酸水素ナトリウム不含、フェノールレッド不含、Gibco社製）10.4g、炭酸水素ナトリウム 2.0g、グルコース 10.0g、モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS） 4.53gを溶解し、1N 水酸化ナトリウム水溶液でpH7.0にした。1000mlにメスアップした後、0.2μmのフィルターでろ過した。

②グルコースYN培地の調製

精製水 約900mlにYN Base (Difco社製) 6.7g、グルコース5gを溶解し、1N 水酸化ナトリウム水溶液により pH5.3にした。精製水で1000mlにメスアップしたのち、0.2μmのフィルターを用いて濾過滅菌した。

③シュクロースYN培地の調製

精製水 約900mlにYN Base (Difco社製) 6.7g、シュクロース20gを溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液により pH7.0にした。精製水で1000mlにメスアップしたのち、0.2μmのフィルターを用いて濾過滅菌した。

【0027】(2) 接種菌液の調製と培養

試験菌株をSabouraud Dextrose Agar (OXOID社製)を用いて35℃で7日間培養した。0.1% Tween 80含滅菌生理食塩水2mLを培地上に滴下し、胞子を浮遊させた。培地上に滴下した上述の生理食塩水を回収し、3～5分静置して沈殿物を除去した後ボルテックスミキサーで混和し、胞子浮遊液を得た。530nmにおける吸光度が0.09～0.11になるように希釈した。調製した胞子浮遊液を各種測定培地で100倍に希釈した後、マイクロプレートの各ウェルに0.2mlずつ分注し呈色試薬（0.7mmol/L WST-8、0.0035mmol/L 1-methoxy PMS、0.5mmol/L フェリシアン化カリウムおよび0.5mmol/L フェロシアン化カリウムを含む）0.02mLを加えた。なお陰性対照として胞子液を接種していない各種測定培地（菌未接種）を調製した。35±1℃にて24時間培養し、主波長450nm、副波長630nmにおける吸光度を測定した。その後1.5mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 0.02mLを各ウェルに添加し、5分後に630nmにおける吸光度を測定した。

【0028】C. 結果

各発育培地における水酸化ナトリウム水溶液添加前後の吸光度を測定した結果を表1にまとめた。グルコース添加MOPS緩衝RPMI1640培地を用い、主波長450nm、副波長630nmにおける吸光度を測定した結果、吸光度は0.153とかなり低かった。そこで、感度を上げるために水酸化ナトリウム水溶液を添加して630nmにおける吸光度を測定した結果、菌未接種においても呈色が認められた。次に、グルコースYN培地およびシュクロースYN培地の水酸化ナトリウム水溶液の添加前後の630nmにおける吸光度を測定した。その結果、グルコースYN培地では菌未接種において呈色する現象がみられた。一方、シュクロースYN培地では菌未接種において呈色はほとんど見られず、菌が発育した場合強く呈色した。したがって、本発明はシュクロースを含む液体培地を用いることにより実施することができる。

【0029】

【表1】

表1 各種培地における水酸化ナトリウム水溶液添加前後の吸光度

	水酸化ナトリウム水溶液添加	測定波長	グルコース添加MOPS緩衝RPMI1640培地	グルコースYN培地	シュクロースYN培地
菌未接種	前	630nm	0.045	0.015	0.013
	後	630nm	0.976	0.968	0.089
菌接種	前	主波長450nm 副波長630nm	0.153	0.024	0.017
	前	630nm	0.208	0.132	0.262
	後	630nm	0.836	0.827	0.787

【0030】【実施例2】糸状菌の増殖度を測定するために以下の内容を実施した。

A. 使用菌株

Aspergillus fumigatus ATCC26430、*Aspergillus fumigatus* KM8001および*Aspergillus niger* ATCC16404を使

用した。

B. 試験方法

(1) シュクロースYN培地の調製

精製水 約900mlにYN Base (Difco社製) 6.7g、シュクロース20gを溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液により p

H7.0にした。精製水で1000mLにメスアップしたのち、 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターを用いて濾過滅菌した。

(2) 接種菌液の調製と培養

試験菌株をSabouraud Dextrose Agar (OXOID社製)を用いて 35°C で7日間培養した。0.1% Tween 80含滅菌生理食塩水2mLを培地上に滴下し、胞子を浮遊させた。培地上に滴下した上述の生理食塩水を回収し、3～5分静置して沈澱物を除去した後ボルテックスミキサーで混和し、胞子浮遊液を得た。530nmにおける吸光度が0.09～0.11になるように希釈した。調製した胞子浮遊液0.1mLをマイクロピペットにて採取し、0.1mg/mLクロラムフェニコール含シュクロースYN培地10mLに加え、ボルテックスミキサーにて充分攪拌し、接種菌液を調製した。

【0031】(3) 濁度法

マイクロプレートの各ウエルに(1)で調製した接種菌液を0.2mLずつ分注した。プレートに蓋をした後、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて培養した。一定時間毎に630nmにおける吸光度を測定した。

(4) 比色法 (本発明による方法)

マイクロプレートの各ウエルに呈色試薬 (0.7mmol/L WST-8、0.0035mmol/L 1-methoxy PMS、0.5mmol/L フェリシアン化カリウムおよび0.5mmol/L フェロシアン化カリウムを含む) 0.02mLと、(1)で調製した接種菌液を0.2mLずつ分注した。プレートに蓋をした後、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて培養した。12時間培養後、3時間間隔で順次培養中のウエルに1.2mol/L 水酸化ナトリウム水溶液0.02mLを各ウエルに添加し、10分後に630nmにおける吸光度を測定した。なお、ブランクとして接種菌液のかわりにシュクロースYN培地を添加した。

【0032】C. 結果

培養12、15、18、21、24時間後に測定した吸光度を図1に示した。図1の縦軸は630nmにおける吸光度、横軸は培養時間を示す。本発明では培養時間にもなって吸光度が増加しており、発育の程度を測定することができた。また濁度がほとんど変化していない18時間でも呈色しており、短時間に検出することが可能であった。したがって、本発明の測定キットおよび測定方法により糸状菌の増殖度を簡便に測定できることが明らかになった。

【0033】〔実施例3〕抗真菌薬感受性試験への適用性検討のため、以下の内容を実施した。

A. 使用菌株

Aspergillus fumigatus ATCC26430を使用した。

B. 試験用マイクロプレート

アムホテリシンB (Amphotericin B : AMPH)、イトラコナゾール (itraconazole : ITCZ) の2薬剤を対象とした。AMPH 0.3～160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ITCZ 0.16～80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の2倍連続希釈系列をジメチルスルホキシドおよび精製水を使用して調製した。調製した薬剤溶液0.02mL/ウエルずつプレートに分注し、24時間減圧下にて乾燥・固相化した後、同ウエルに呈色試薬 (0.7mmol/L WST-8、0.0035mmol/L

1-methoxy PMS、0.5mmol/L フェリシアン化カリウムおよび0.5mmol/L フェロシアン化カリウムを含む) を0.02mL/ウエルずつ分注し、24時間減圧下にて再度乾燥・固相化した。

【0034】C. 試験方法

(1) 濁度法

比較例として、NCCLS M-38P (0.2mL培養系のマイクロ液体希釈法) にしたがって実施した。

(2) 本発明のマイクロプレート法

1) シュクロースYN培地の調製

精製水 約900mLにYN Base (Difco社製) 6.7g、シュクロース20gを溶解し、1N水酸化ナトリウム水溶液によりpH7.0にした。精製水で1000mLにメスアップしたのち、 $0.2\mu\text{m}$ のフィルターを用いて濾過滅菌した。

2) 接種菌液の調製と培養

試験菌株をSabouraud Dextrose Agar (OXOID社製)を用いて 35°C で7日間培養した。0.1% Tween 80含滅菌生理食塩水2mLを培地上に滴下し、胞子を浮遊させた。培地上に滴下した上述の生理食塩水を回収し、3～5分静置して沈澱物を除去した後ボルテックスミキサーで混和し、胞子浮遊液を得た。530nmにおける吸光度が0.09～0.11になるように希釈した。調製した胞子浮遊液0.1mLをマイクロピペットにて採取し、シュクロースYN培地20mLに加え、ボルテックスミキサーにて攪拌し、接種菌液を調製した。B記載の試験用マイクロプレートの各ウエルに接種菌液を0.2mLずつ分注し、プレートに蓋をした後、 $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ にて24時間培養した。なお、ブランクとして接種菌液のかわりにシュクロースYN培地を添加した。

3) 判定方法

24時間後に各ウエルに1.5mol/L 水酸化ナトリウム水溶液0.02mLを添加し、添加5分後に630nmにおける吸光度を測定した。

1. AMPHは陰性コントロールと同等またはそれ以下の吸光度を示した最小濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

2. ITCZは 80% 発育阻止濃度 (IC80) を判定した。以下の計算式により求めた吸光度に相当するかそれ以下の値を示すウエルの薬剤濃度をMICとした。(IC80 = (陽性コントロール - 陰性コントロール) \times 0.2 + 陰性コントロール)

【0035】D. 結果

本発明により薬剤感受性を実施し、吸光度を測定した結果を図2に示す。横軸は抗真菌薬の濃度、縦軸は630nmにおける吸光度を示す。AMPHでは、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、ITCZでは、0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で吸光度の上昇が認められた。目視においては、AMPHの場合0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で青色～濃青色を呈し、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ではほとんど呈色せず、ITCZの場合0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下で青色～濃青色を呈し、0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上ではほとんど呈色しなかった。また、NCCLS M-38

P法および本発明法により反復して薬剤感受性試験を実施し、判定したMICを表2にまとめた。表中、許容範囲とはNCCLS M38-Pに記載されている参照値をいう。この結果、本発明で判定したMICはNCCLS M38-Pに記載されている許容範囲と一致した。また、目視で判定したMICは吸光度で判定した結果と同様であった。さらに、NCCLS M3

8-P法では判定時間が46～50時間であるが、本発明では約半分の24時間でおこなうことができた。したがって、本発明の測定試薬および測定方法は糸状菌の抗真菌薬感受性試験に有用である。

【0036】

【表2】

表2 *A.fumigatus* ATCC26430 の MIC (数値は $\mu\text{g/ml}$)

	測定方法	MIC	許容範囲
AMPH	M-38P(濁度法)	0.5-2.0	0.5-2.0
	比色法	0.5-1.0	
ITCZ	M-38P(濁度法)	0.12-0.25	0.12-1.0
	比色法	0.12-0.25	

【0037】

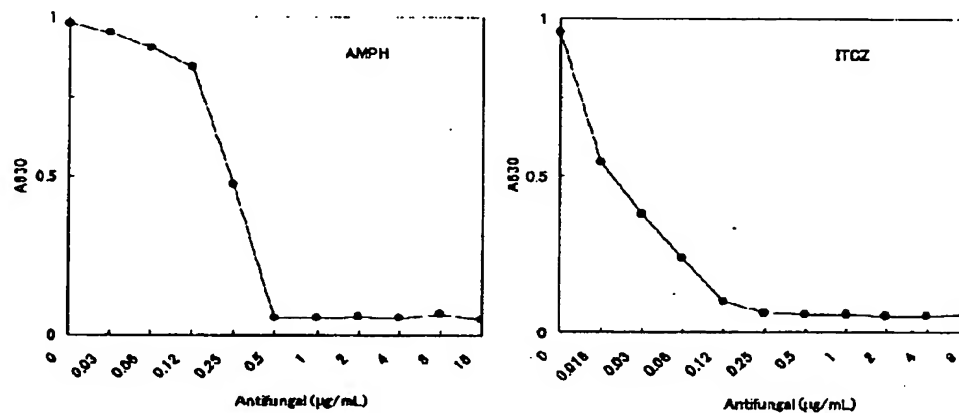
【発明の効果】本発明の検出方法および検出キットによれば、微生物、特に酵母様真菌および糸状菌の検出を簡便に行うことができる。また、本発明による薬剤感受性試験方法およびそのためのキットは、糸状菌の液体希釈法による抗真菌薬感受性試験に有用である。

【図面の簡単な説明】

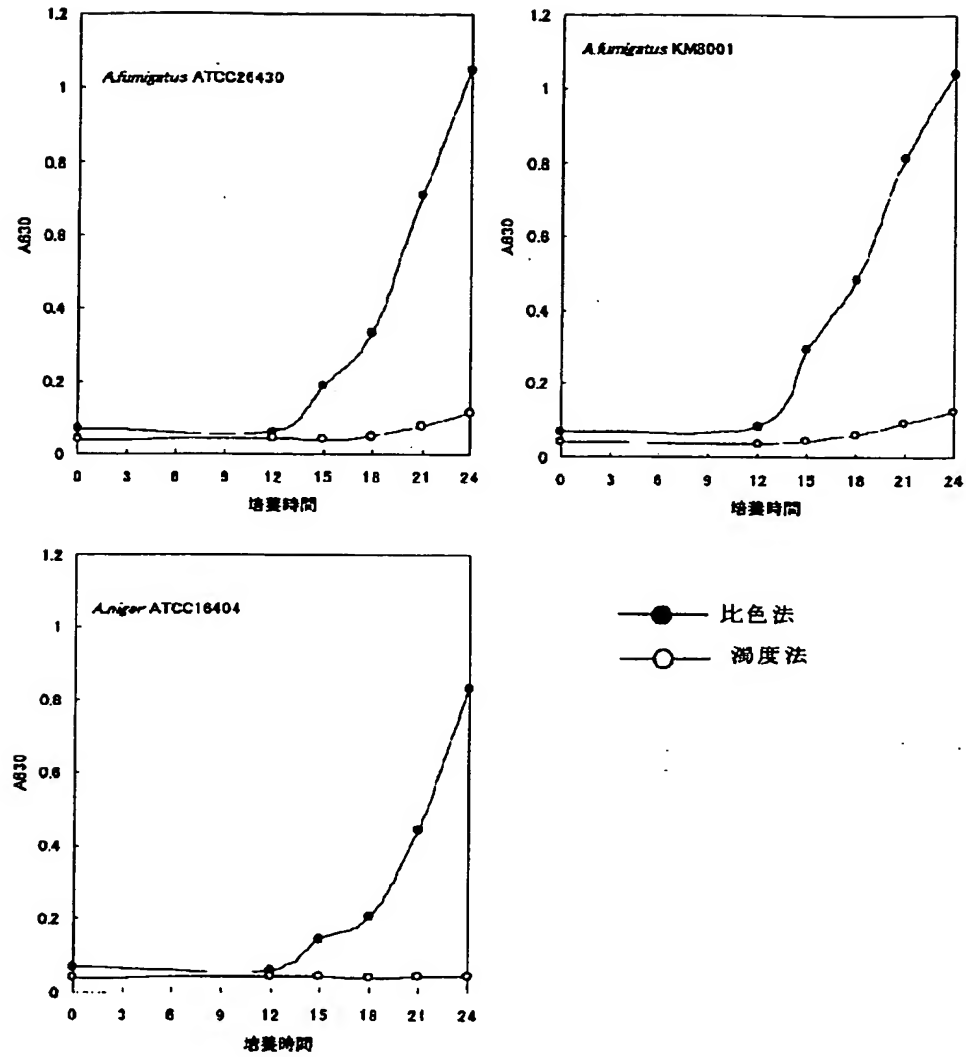
【図1】 濁度および本発明の比色法における培養時間に対する吸光度の変化を示したグラフである。

【図2】 *A. fumigatus* ATCC26430 の薬剤感受性試験を行なった際の抗真菌薬の濃度に対する吸光度の変化を示したグラフである。

【図2】



【図1】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G054 AA10 CE01 EA06 GB01
 4B063 QA18 QA19 QQ07 QR41 QR44
 QR66 QS24 QX01
 4B065 AA58X AA72X AC20 BB02
 BB03 BB11 BB12 BB16 BB37
 BC02 CA46